

10/526035

11. DEZ. 2003

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PCT/EP 03 / 09625



REC'D 21 JAN 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 40 154.3

Anmeldetag: 30. August 2002

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Trostberg/DE;
Degussa BioActives GmbH, Freising/DE.

Bezeichnung: Pflanzliche Proteinfraction mit Phospholipase
D-Aktivität

IPC: C 12 N 9/14

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. Dezember 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**BEST AVAILABLE COPY**

Degussa AG
83308 Trostberg

Degussa BioActives GmbH
85354 Freising

Trostberg, 29. August 2002

Unser Zeichen: S-MS-IPM-PAT
Dr.Krö-ls/hg
DHN 10

Pflanzliche Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pflanzliche Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität.

Phospholipase D (PLD), bei der es sich um eine Phosphatidylcholin-Cholinhydrolase (EC 3.1.4.4) handelt, ist ein wichtiges Enzym des Phospholipidmetabolismus und ist in der Natur weit verbreitet.

Phospholipase D wird einer Enzymklasse zugerechnet, deren Vertreter in heterogenen Systemen wasserunlösliche Substrate umsetzen können, da sie an der Grenzfläche zwischen einem Lipid und Wasser Reaktionen katalysieren können. Dieses amphiphile Verhalten der Phospholipase D hat sie für die Wissenschaft besonders interessant erscheinen lassen, so dass in den vergangenen Jahrzehnten zahlreiche unterschiedliche Phospholipasen D (-Spezies) aus den unterschiedlichsten Quellen isoliert werden konnten. Insbesondere wird PLD eine Beteiligung an zellregulatorischen Aktivitäten im Zusammenhang mit dem interzellulären Signalaustausch zugeschrieben. Über ihre Hydrolyse-Aktivität hinaus können PLD-Enzyme auch Phosphatidyl-Reste auf Alkohole übertragen. Allgemein werden PLD-Varianten deshalb für den biokatalytischen Austausch von Kopfgruppen der Phospholipide eingesetzt.

So sind z.B. Enzymfraktionen aus Plastiden von Zuckerrübe, Spinat oder Kohlblättern bekannt, sowie aus Chromoplasten von Karotten. Entsprechende Fraktionen mit Phospholipase D-Aktivität wurden ebenfalls aus Mitochondrien und Mikrosomen unreifer Erdnussamen gewonnen, aber auch aus Ricinus-Samen, Arabidopsis-Spezies und Tomate.

Auch aus entfettetem Baumwollsaamenmehl ist es gelungen, ein entsprechendes Enzym zu extrahieren.

Neben pflanzlichen Quellen dienen auch Mikroorganismen als Quelle, wobei insbesondere Corynebakterien (*Corynebacterium ovis*), *Escherichia*

coli, Bäckerhefezellen und Streptomyeten (*Streptomyces hachijoensis*) zu nennen sind.

Phospholipase konnte aber auch aus Säugetierzellen isoliert werden, wie z. B. aus menschlichen Eosinophilen und Rattenhirnmikrosomen.

Hinsichtlich des Molekulargewichts bietet sich bezüglich der bekannten Phospholipasen D ein heterogenes Bild:

So weist das aus Baumwollsaamen isolierte lösliche Enzym ein Molekulargewicht von $71\,000 \pm 3\,000$ Da auf; Phospholipase D aus Erdnusssamen besitzt ein Molekulargewicht von $200\,000 \pm 10\,000$ Da und PLD aus menschlichen Eosinophilen ein Molekulargewicht von ca. 60 000 Da.

Entsprechende bakterielle Enzyme, wie sie bspw. aus *Corynebacterium ovis* isoliert werden können, besitzen ein Molekulargewicht von annähernd 90 000 Da.

Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes sind für Phospholipase D aus Erdnusssamen pI-Werte von 4,65 bekannt, wo hingegen der pI eines Rohextraktes aus menschlichen Eosinophilen zwischen 4,8 und 5,0 liegt und durch zusätzliche Aufreinigung einen Wert zwischen 5,8 und 6,2 annehmen kann.

Einen Überblick zum Kenntnisstand bezüglich Phospholipase D gibt der Übersichts-Beitrag von Michael Heller in *Advanced Lipid Research*, 1978, Band 16, Seiten 267 bis 326.

Von Mohn-Samen ist bekannt, dass sie in der Lage sind, in außergewöhnlich hohem Ausmaß sekundäre Metabolite zu bilden. So können bspw. schon nach wenigen Tagen des Anquellens Alkaloide wie Thebain im Mohn-Samen nachgewiesen werden, was sie vor allem auch im Hinblick auf die Opium-Gewinnung interessant macht.

Da Phospholipase D (PLD) eine immer wichtigere Rolle bei der industriell genutzten katalytischen Hydrolyse von Glycerophospholipiden wie z.B. Phosphatidylcholin (PC) zu Phosphatidsäure (PA) spielt, aber auch bei Transphosphatidylierungs-Vorgängen zum Kopfgruppenaustausch der Phospholipide, hat sich für die vorliegende Erfindung die Aufgabe gestellt, neue pflanzliche Proteinfractionen mit Phospholipase D-Aktivität zu isolieren.

Gelöst wurde diese Aufgabe durch eine entsprechende Proteinfraction, die aus Vertretern der Familie Papaveraceae stammt.

Unter den nachfolgend verwendeten Begriff "Proteinfraction" fallen definitionsgemäß alle tatsächlichen Proteinfractionen und Proteine sowie deren mögliche Varianten und auch sämtliche Enzyme und Enzym-Varianten, alle mit entsprechender PLD-Aktivität.

Überraschend konnte bei dieser pflanzlichen Proteinfraction festgestellt werden, dass sie Isoenzymeinheiten enthält, die beide ein relativ enges Molekularmassenspektrum aufweisen und deren Aktivitätsoptima zum einen im stark Sauren, zum anderen aber im leicht Basischen liegen. Aufgrund der bislang vorliegenden Erkenntnisse mit Phospholipasen D aus pflanzlichen Quellen konnte nicht erwartet werden, dass in Vertretern der Familie der Papaveraceae Proteinfractionen mit entsprechenden Aktivitäten aufgefunden werden.

Die vorliegende Erfindung beansprucht insbesondere eine Proteinfraction, die aus *Papaver somniferum* (Schlafmohn) stammt und ganz besonders bevorzugt aus sich entwickelnden Keimlingen und/oder aus Endospermen. Von der Erfindung ist aber auch eine Verfahrensvariante mitumfasst, bei der die beanspruchten Proteinfractionen indirekt aus *Papaver* stammen, indem diese nämlich mit Hilfe rekombinanter Methoden erhalten wurden, vor allem mit Hilfe rekombinanter Mikroorganismen, die die Gene für die entsprechende Proteinfraction enthalten.

Wie bereits ausgeführt, hat es sich als überraschend erwiesen, dass die beanspruchte pflanzliche Proteinfraction zwei Isoenzymen enthält, weshalb die vorliegende Erfindung eine Proteinfraction bevorzugt, die aus zwei Proteinunterfraktionen A und B besteht, wobei die Unterfraktion A eine Molekularmasse zwischen 116 und 118 kDa, einen isoelektrischen Punkt pI zwischen 8,5 und 8,9 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 7,8 und 8,2 und die Unterfraktion B eine Molekularmasse zwischen 112 und 115 kDa, einen isoelektrischen Punkt pI zwischen 6,5 und 6,9 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0 besitzen; darüber hinaus ist als bevorzugt anzusehen, dass die Proteinfraction ein Aktivitätsoptimum bei Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen zwischen 40 μM und 100 mM besitzt und zusätzlich durch Zn^{2+} -Ionen aktivierbar ist.

Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes kann durch weitere Aufreinigung isolierter Fraktionen ein definierter Wert erreicht werden.

Die Proteinfraction der vorliegenden Erfindung ist aus diesem Grund auch insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktion A einen isoelektrischen Punkt pI von 8,7 und eine Molekularmasse von 116,4 kDa sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 aufweist. Die entsprechenden bevorzugten Werte der Unterfraktion B betragen hinsichtlich der Molekularmasse 114,1 kDa, hinsichtlich des isoelektrischen Punktes pI 6,7 sowie ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum, das bei pH 5,5 liegt. Auch diese Merkmale werden von der vorliegenden Erfindung umfasst.

Üblicherweise sind die Proteinfraktionen mit Phospholipase D-Aktivität Calciumionen-abhängig. Diese Abhängigkeit hat sich auch für die beanspruchte pflanzliche Proteinfraction aus Papaveraceen bestätigt, wobei das Aktivitätsoptimum dieser Proteinfraction bei Calcium-Ionenkonzentrationen zwischen 2 und 20 mM und besonders bevorzugt zwischen 5 und 15 mM liegt.

Bezüglich der Unterfraktion B beansprucht die vorliegende Erfindung eine Variante, deren Aktivierbarkeitsoptimum bei Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen zwischen 1,0 und 10 mM und besonders bevorzugt bei 5 mM liegt.

Schließlich sieht die vorliegende Erfindung auch vor, dass die Unterfraktionen A und/oder B Kohlenhydratanteile aufweisen, und dass es sich bei den Unterfraktionen A und B um Isoenzyme handelt.

Mitumfasst ist erfindungsgemäß auch eine Variante der beanspruchten Proteinfraction, bei der die Transphosphatidylierungs-Aktivität stärker ausgeprägt ist als ihre Hydrolyse-Aktivität, was vor allem auch im Hinblick auf die bislang bekannten PLD-Varianten von Bedeutung ist, denen gegenüber die neuen Proteinfractionen bis 100 mal ausgeprägtere Transphosphatidylierungs-Aktivitäten bezogen auf die entsprechenden Hydrolyse-Aktivitäten aufweist.

Neben der Proteinfraction selbst beansprucht die vorliegende Erfindung auch die Verwendung dieser Proteinfraction zur Hydrolyse und/oder Transphosphatidylierung von Phospholipiden und/oder deren Lyso-Formen, wobei insbesondere die Synthese von Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinosit, Phosphatidsäure, Phosphatidylserin, deren Lyso-Formen und beliebige Mischungen beansprucht werden. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass die erfindungsgemäße Proteinfraction in der Lage ist, Phosphatidylinosit zu hydrolysieren bzw. am PI einen Kopfgruppenaustausch durchzuführen, was von den bislang bekannten PLDs so ebenfalls nicht bekannt ist. Dabei ist die Reaktionsführung insgesamt als nicht kritisch anzusehen, doch haben sich als Reaktionsmedien organische und/oder wässrige Phasen und als Phospholipid-Quelle Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin als sehr geeignet erwiesen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dieser neuen pflanzlichen Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität aus Vertretern der Familie der Papaveraceae die Isolierung einer PLD gelungen ist, deren beide

Unterfraktionen hydrolytische Aktivitäten insbesondere gegenüber Phosphatidylcholin aufweisen, die beide durch Calciumionen aktiviert werden können, die aber im Gegensatz zu bekannten Phospholipase D-Varianten aus anderen Pflanzen bezüglich der Unterfraktion B auch durch Zn^{2+} -Ionen aktiviert werden können.

Die nachfolgenden Beispiele verdeutlichen die charakteristischen Merkmale der beanspruchten pflanzlichen Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität.

Beispiele

Aufarbeitung pflanzlichen Materials (Enzymgewinnung)

Mohn-Samen (*Papaver somniferum*) wurden auf einer 10 mm dicken Polyurethan-Schaumschicht in Petrischalen, die mit einem Nylongewebe abgedeckt waren, in destilliertem Wasser zum Keimen gebracht. Der Keimungsprozess wurde in Dunkelheit bei 25 °C und 70 bis 80 % relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt. Am zweiten Tag nach dem Anquellen wurde von den Keimlingen das Endosperm entfernt.

Diese aus insgesamt 10 g frischem Mohn-Samen gewonnenen Endospermen wurden mit einer geringen Menge kalten Acetons in einem Mörser verrieben und anschließend mit 300 ml kalten Acetons, das 300 g festes CO₂ enthielt, homogenisiert. Anschließend wurde das so erhaltene Präzipitat mit kaltem Aceton so lange gewaschen, bis das Filtrat farblos und transparent war. Der vakuumgetrocknete Rückstand war in Pulverform für mehrere Monate bei 4 °C stabil.

2 g dieses Acetonpulvers wurden in 50 ml einer Mischung aus 0,1 molarem Natriumacetat-Puffer/10 mM CaCl₂/6 mM Cysteinhydrochlorid (pH 5,5) homogenisiert und bei 12 000 g bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die daraus resultierenden Extrakte wurden mit (NH₄)₂SO₄ (60 % Sättigung) behandelt und bei 26 000 g und 4 °C für 45 Minuten zentrifugiert. Der Niederschlag wurde anschließend in einer möglichst geringen Menge einer Mischung aus 0,1 M Natriumacetat-Puffer/10 mM CaCl₂/6 mM Cysteinhydrochlorid (pH 5,5) aufgenommen. Nach einer Dialyse gegen eine Mischung aus 0,01 molarem Natriumacetat-Puffer/50 mM CaCl₂ (pH 5,5) wurde die Enzymlösung auf eine Octyl-Sepharose CL-4B-Säule aufgetragen. Mit folgenden Lösungen wurden die Proteine mit einer Flussrate von 9 ml/h dreistufig eluiert: 0,01 M Natriumacetat-Puffer/50 mM CaCl₂; 0,005 M Natriumacetat-Puffer/30 mM CaCl₂ (pH 5,5); 0,005 M Natriumacetat-Puffer/0,1 mM Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA), pH 5,5. Die Enzymaktivität wurde mit Phosphatidyl-p-Nitrophenol (PpNP) bei pH-Werten von 5,5 und 8,0 bestimmt und die vereinten aktiven Fraktionen wurden mit Hilfe einer 100 kDa-Membran aufkonzentriert.

Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde entsprechend der Standardmethode von M.M. Bradford (Anal. Biochem. 72, 1976, 248 – 254) mit Rinderserum-Albumin als Standard bestimmt.

Hydrolytische Aktivität in wässrigen Systemen

Die hydrolytische Aktivität der so erhaltenen pflanzlichen Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität wurde in einem wässrigen System ermittelt, indem das aus PpNP freigesetzte p-Nitrophenol bestimmt wurde (Methode nach P. D'Arrigo, V. Piergianni, D. Scarcelli, S. Servi, "A Spectrophotometric Essay for Phospholipase D", Anal. Chim. Acta, 304, 1995, 249 – 254).

Zur Charakterisierung der jeweiligen Aktivitäten der PLD-Unterfraktionen A und B wurden die Reaktionen bei unterschiedlichen pH-Werten in Gegenwart von 10 mM CaCl_2 , in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von CaCl_2 bei pH-Werten von 5,5 bzw. 8,0 sowie in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von ZnCl_2 bei einem pH-Wert von 5,5 durchgeführt.

Transphosphatidylierung und hydrolytische Aktivität in einem Zwei-Phasensystem

Entsprechend der Methode gemäß N. Dittrich und R. Ulbrich-Hofmann ("Transphosphatidylation by immobilised Phospholipase D in aqueous media", Biotechnol. Appl. Biochem. 34, 2001, 189 – 194) wurden die Transphosphatidylierungs- und Hydrolyseaktivitäten im Zwei-Phasensystem bestimmt. Die entsprechenden Reaktionsmedien setzten sich aus einem Phosphatidylcholin enthaltenden Diethylether, Glycerin (zur Bestimmung der Transphosphatidylierungs-Aktivität) oder Wasser (zur Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität) sowie einem Gemisch aus Tris-HCl/ CaCl_2 oder einem Gemisch aus Natriumacetat-Puffer/ CaCl_2 und einem gereinigten Enzym (PLD-A und PLD-B) zusammen. Die jeweiligen Reaktionen wurden bei 30 °C in Reaktionsgefäßen, die mit Teflon-Silikon-Septen verschlossen waren, bei einer Schüttelfrequenz von 250/Min. durchgeführt. Während der Reaktion

wurden Aliquote der organischen Phase(n) mittels HPTLC analysiert. Die Phospholipidgehalte wurden densitometrisch bei 550 nm gegenüber Standardmischungen aus Phosphatidylcholin, Phosphatidsäure und Phosphatidylglycerin bestimmt, wobei aus der Zunahme an Phosphatidylglycerin oder Phosphatidsäure die Enzymaktivität berechnet wurde.

Bestimmung von Enzymmerkmalen

Die Bestimmung der Molekularmasse der gereinigten Proteine erfolgte mit Hilfe einer Elektrophorese in Gegenwart von SDS mit einer Bio-Rad Mini Protein II Gel-Elektrophoresezelle unter Verwendung von Polyacrylamidgelen.

Die isoelektrischen Punkte der PLD-Unterfraktionen A und B wurden mit Hilfe eines PhastGel IEF 3 – 9 on FastSystem Separation and Controll Unit (Pharmacia LKB Biotechnology) bestimmt, wobei pI IEF-Marker (liquid mix 3 – 10) für die Kalibrierung eingesetzt wurden. Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 gefärbt.

Zur Glycoprotein-Bestimmung wurde ein SDS-PAGE-Gel, das PLD-A, PLD-B und Peroxidase (als Standard für ein glycosiliertes Protein) sowie Aldolase (als Standard eines nicht-glycosilierten Proteins) enthielt, mit einer Nitrocellulose-Membran bei 300 V und 5 mA/cm² über eine Dauer von 180 Minuten in Kontakt gebracht. Nach dem Proteintransfer wurde der Gesamtkohlenhydrat-Gehalt mit einem ECL-Glycoprotein-Detektionsmodul bestimmt.

Mit einem 492 cLC-Protein-Sequencer (PE Applied Biosystems) wurden Sequenzierungen N-terminierter Aminosäuren durchgeführt.

Ergebnisse:

Die mit Hilfe einer hydrophoben Interaktionschromatographie zur Aufreinigung von PLD entsprechend R. Lambrecht, R. Ulbrich-Hofmann ("A facile purification procedure of phospholipase D from cabbage and its characterization", Biol. Chem. Hoppe-Seyler 373, 1992, 81 – 88) erhaltenen

zwei Enzymformen waren bei pH 8,0 (PLD-A) bzw. pH 5,5 (PLD-B) aktiv. Durch den Austausch von CaCl_2 durch ZnCl_2 in Pufferlösungen, konnten die gleichen Aufreinigungsergebnisse erzielt werden. Beide Enzymunterfraktionen waren im SDS-PAGE-Gel homogen. Tabelle 1 veranschaulicht die Aufreinigungsdaten, wobei die Aufreinigungsfaktoren der beiden Isoenzyme 84,7 (PLD-A) bzw. 94,1 (PLD-B) betrugen.

Proteinbestimmung der beiden Unterfraktionen

Mit Hilfe der SDS-PAGE-Methode wurden die Molekularmassen der PLD-Unterfraktion-A und der PLD-Unterfraktion-B mit 116,4 bzw. 114,1 kDa bestimmt. Deren isoelektrischen Punkte lagen bei 8,7 (PLD-A) und 6,7 (PLD-B). Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl PLD-A als PLD-B in glycosilierter Form vorlagen, da eine positive Deglycosilierungsreaktion mit Hilfe von N-Glycosidase F das Vorhandensein eines N-gebundenen Kohlenhydrats für beide Unterfraktionen ergab. Da die N-terminale Sequenzierungsmethode an beiden Unterfraktionen versagte, ist davon auszugehen, dass in beiden Fällen eine N-terminale Modifizierung vorliegt.

pH-Aktivitätsprofile

Gegenüber PpNP ergaben sich hinsichtlich der hydrolytischen Aktivitäten der PLD-Unterfraktionen A und B und als Funktion des pH-Wertes signifikante Unterschiede. Die Unterfraktion A besitzt ein scharfes pH-Optimum bei pH 8,0, wo hingegen bei diesem pH-Wert die Aktivität der Unterfraktion B unausgeprägt ist. Dem gegenüber liegt das pH-Optimum der Unterfraktion B bei pH 5,5, bei dem die Unterfraktion A kaum Aktivität zeigt. Unter jeweils optimalen Bedingungen zeigt die Unterfraktion B eine gegenüber der Unterfraktion A um 38 % ausgeprägtere Aktivität.

Einfluss von Metallionen

Hinsichtlich der von PLD-Varianten bekannten Aktivierung durch Ca^{2+} -Ionen wurde auch bezüglich der neuen Unterfraktionen A und B aus Schlafmohn eine Calciumionen-Abhängigkeit festgestellt, wobei ein Aktivitätsmaximum mit einer 10 mM CaCl_2 -Konzentration erzielt werden konnte. Mit Mg^{2+} -Ionen konnte eine nur sehr geringfügige Aktivierung der

beiden Untereinheiten erzielt werden, wohingegen Zn^{2+} -Ionen die PLD-Unterfraktion B stärker aktivierten als Calciumionen. Mit einer optimalen Zn^{2+} -Ionenkonzentration (5 mM) konnte die Unterfraktion B um mehr als das vierfache stärker aktiviert werden, als mit den optimalen Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen.

Transphosphatidylierungs- und hydrolytische Aktivitäten in einem 2-Phasen-System

In einem biphasischen System bestehend aus einem Natriumacetat- (pH 5,5) oder Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) und 40 mM CaCl_2 , Diethylether mit Phosphatidylcholin als Substrat und Glycerin als Akzeptor-Alkohol, wurden die Transphosphatidylierungs-Potentiale der Unterfraktionen A und B mittels HPTLC und densitometrischer Quantifizierung der Reaktionsprodukte bestimmt. Die PLD-Unterfraktion B besaß bei pH 5,5 ein großes Transphosphatidylierungs-Potential, da nach 240 Minuten mehr als 80 % des Phosphatidylcholins in das Transphosphatidylierungs-Produkt Phosphatidylglycerin umgewandelt worden waren, wohingegen unter diesen Reaktionsbedingungen keinerlei Phosphatidsäure gefunden werden konnte. Bei einem pH-Wert von 8,0 konnten für PLD-B weder eine Transphosphatidylierung noch eine Hydrolyse festgestellt werden. Die PLD-Unterfraktion A zeigte weder bei pH 5,5 noch pH 8,0 eine Transphosphatidylierungs-Aktivität, wie erwartet zeigte sie aber eine ausgeprägte Hydrolyse-Aktivität bei pH 8,0.

Tabelle 1: Aufreinigung von Proteinfractionen mit PLD-Aktivität aus Schlafmohn-Samen.

Die hydrolytische PLD-Aktivität der Proteinfraction wurde gegenüber PpNP bei pH 8,8 und 5,0 bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein [mg]	Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}$]		Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$]	
		pH 8,0	pH 5,5	pH 8,0	pH 5,5
Rohextrakt *	43,25	3,74	4,65	0,09	0,11
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitat **	9,56	1,99	2,38	0,02	0,25
Octyl-Sepharose CL-4B					
Unterfraktion A (PLD-A)	0,14	1,05	-	7,32	-
Unterfraktion B (PLD-B)	0,18	-	1,85	-	10,13

* nach Homogenisieren des Acetonpulvers und Zentrifugieren bei 12 000 g.

** nach Zentrifugieren des Präzipitats bei 26 000 g und anschließender Dialyse.

Patentansprüche

1. Pflanzliche Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Vertretern der Familie Papaveraceae stammt.
2. Proteinfraction nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus Papaver somniferum stammt und ganz besonders bevorzugt aus sich entwickelnden Keimlingen und/oder aus Endospermen, oder dass sie mit Hilfe rekombinanter Methoden aus Papaver erhalten wurde.
3. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie aus zwei Protein-Unterfraktionen A und B besteht, wobei die Unterfraktion A eine Molekularmasse zwischen 116 und 118 kDa, einen isoelektrischen Punkt pI zwischen 8,5 und 8,9 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 7,8 und 8,2 und die Unterfraktion B eine Molekularmasse zwischen 112 und 115 kDa, einen isoelektrischen Punkt pI zwischen 6,5 und 6,9 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH-Werten zwischen 5,0 und 6,0 besitzen, dass die Proteinfraction ein Aktivitätsoptimum bei Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen zwischen 40 μM und 100 mM besitzt und durch Zn^{2+} -Ionen aktivierbar ist.
4. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktion A eine Molekularmasse von 116,4 kDa, einen isoelektrischen Punkt pI von 8,7 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 aufweist.
5. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktion B eine Molekularmasse von 114,1 kDa, einen isoelektrischen Punkt pI von 6,7 und ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 5,5 aufweist.
6. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Aktivitätsoptimum bei Ca^{2+} -

Ionenkonzentrationen zwischen 2 und 20 mM und besonders bevorzugt zwischen 5 und 15 mM liegt.

7. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktion B ein Aktivierbarkeitsoptimum bei Zn^{2+} -Ionenkonzentrationen zwischen 1,0 und 10 mM und besonders bevorzugt bei 5 mM besitzt.
8. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Unterfraktionen A und/oder B Kohlenhydratanteile aufweisen.
9. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Unterfraktionen A und B um Isoenzyme handelt.
10. Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass ihre Transphosphatidylierungs-Aktivität stärker ausgeprägt ist als ihre Hydrolyse-Aktivität.
11. Verwendung der Proteinfraction nach einem der Ansprüche 1 bis 10, zur Hydrolyse und/oder Transphosphatidylierung von Phospholipiden und/oder deren Lyso-Formen.
12. Verwendung nach Anspruch 11 zur Synthese von Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylinosit, Phosphatidsäure, Phosphatidylserin und deren Lyso-Formen.
13. Verwendung nach einem der Ansprüche 11 oder 12 in Form einer Hydrolyse von Phosphatidylinosit und/oder eines Kopfgruppenaustauschers an Phosphatidylinosit.

Zusammenfassung

Es wird eine neue pflanzliche Proteinfraction mit Phospholipase D-Aktivität beansprucht, die aus Vertretern der Familie Papaveraceae und insbesondere Papaver somniferum stammt und die sich aus zwei Proteinunterfraktionen A und B zusammensetzt, deren Molekularmasse insbesondere bei 116,4 kDa bzw. 114,1 kDa liegt, die einen isoelektrischen Punkt pI von 8,7 bzw. 6,7 besitzen und die ein hydrolytisches Aktivitätsoptimum bei pH 8,0 bzw. 5,5 aufweisen. Ferner kann die Unterfraktion B durch Zn^{2+} -Ionen aktiviert werden. Diese neue Proteinfraction, die aus zwei Isoenzymen bestehen kann, wird vor allem zur Hydrolyse und/oder Transphosphatidylierung von Phospholipiden und deren Lyso-Formen eingesetzt.